

Molecular mimicry by rat cytomegalovirus

Citation for published version (APA):

Beisser, P. S. (1999). *Molecular mimicry by rat cytomegalovirus*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19991222pb>

Document status and date:

Published: 01/01/1999

DOI:

[10.26481/dis.19991222pb](https://doi.org/10.26481/dis.19991222pb)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

SUMMARY

Cytomegaloviruses (CMVs) are widespread species-specific betaherpesviruses that persist life-long in infected individuals. Although infection is predominantly asymptomatic in the immunocompetent host, in immunocompromised patients, such as transplant recipients and people suffering from AIDS, CMV can cause life-threatening disease. The effectiveness of existing CMV-specific antiviral agents and vaccines is limited, necessitating a continuing study of the molecular biology of CMV. The genome of human CMV (HCMV) consists of approximately 230 kb of double-stranded DNA and harbors at least 180 virus genes. The majority of these genes are yet uncharacterized. Some HCMV genes show significant sequence similarity with genes of the host organism. Among these are genes that show similarity with mammalian genes that encode chemokines, chemokine receptors, heavy chains of the class I major histocompatibility complex (MHC), tumor necrosis factor receptors and T-cell receptor γ chains. The functions of these genes are not well understood. It is difficult to study their role in the pathogenesis of HCMV infection *in vivo*, due to the species-specificity of HCMV. The rat CMV (RCMV) genome is collinear with the genome of HCMV and the majority of the genes are conserved. Since RCMV infection can be studied *in vivo*, the rat/RCMV system can be used as a model to examine the *in vivo* function of the CMV genes that are homologous to host genes. This thesis reports the characterization of four RCMV genes: a major immediate early transactivator gene (R122-123), a putative chemokine receptor gene (R33), an orphan G protein-coupled receptor gene (R78) and a MHC class I heavy chain gene (r144). The role of R33, R78 and r144 were studied both *in vitro* and *in vivo*, by generating mutant RCMV strains in which either of these genes was disrupted. The efficiency of infection of these mutants was compared with that of wild-type (wt) RCMV in various cell types *in vitro* as well as in immunocompromised rats. The three strains that resulted from deleting either R33, R78 or r144 (mutant viruses RCMV Δ R33, RCMV Δ R78 and RCMV Δ r144, respectively), displayed a diversity of interesting phenotypes. RCMV Δ R33 was able to replicate *in vitro* with a similar efficiency as wt RCMV. However, this mutant was less pathogenic than wt virus in infected immunocompromised rats. Moreover, RCMV Δ R33 could not be detected in the rat salivary glands, the key organ for virus replication during primary RCMV infection. Therefore, we con-

clude that the R33 gene is a determinant of the salivary gland tropism of RCMV. In contrast to RCMV Δ R33, the RCMV R78 null mutants were attenuated in vitro. They replicated less efficiently than wt RCMV in fibroblasts and smooth muscle cells in vitro. Furthermore, the R78-deleted viruses induced syncytia formation in infected fibroblasts in vitro. Hence, we hypothesize that the R78 gene is involved in the stabilization of protein complexes enabling either cell-to-cell spread of virus or viral egress from infected cells. In addition to the differences that we found in vitro, we observed that the R78 deletion mutant strains were also less pathogenic than wt RCMV in vivo. However, it is not known whether the observed syncytia formation in vitro can be related to the lower virulence of these mutants in vivo. Another RCMV gene that we studied is r144, which putatively encodes an MHC class I homolog. Deletion of the r144 gene from the RCMV genome generated a recombinant virus (RCMV Δ r144) that replicated with similar efficiency as wt RCMV in vitro. Unexpectedly, we were unable to detect differences in pathogenicity between wt and mutant virus after infection of immunocompromised rats. A difference between wt RCMV and RCMV Δ r144 was seen, however, in a local, rat foot pad infection model. We found that the influx of macrophages and CD8⁺ T-cells at the site of inoculation was significantly lower in RCMV Δ r144-infected rats than in wt RCMV-infected rats. This indicated that the r144 gene could play a role in the recruitment of a subset of leukocytes to the site of initial RCMV infection.

SAMENVATTING

Cytomegalovirussen (CMV's) zijn veelvuldig voorkomende, gastheerspecifieke beta-herpesvirussen, die levenslang in geïnfecteerde individuen persisteren. Alhoewel infectie in immuuncompetente personen voornamelijk asymptomatisch is, kan CMV een levensgevaarlijke bedreiging vormen in immuun-gecompromitteerden, zoals transplantatie- en AIDS-patiënten. De effectiviteit van bestaande, CMV-specifieke antivirale middelen en vaccins is beperkt, hetgeen de noodzaak van moleculair biologisch onderzoek van CMV rechtvaardigt. Het genoom van humaan CMV (HCMV) bestaat uit 229 kb dubbelstrengs-DNA en bevat tenminste 180 virus-genen. De meerderheid van deze genen is nog niet gekarakteriseerd. Sommige HCMV-genen vertonen significante overeenkomsten in sequentie met genen van de gastheer, waaronder genen die homologie vertonen met die van chemokinen, chemokine-receptoren, major histocompatibility complex (MHC's) klasse I zware ketens, tumor necrose factor-receptoren en T-cel-receptor γ -ketens. De functies van deze HCMV-genen zijn nog onduidelijk. De gastheerspecificiteit van HCMV bemoeilijkt de mogelijkheid om de rol van deze genen in de pathogenese van HCMV-infectie in vivo te bestuderen. Het rat-CMV (RCMV) -genoom is co-lineair met het HCMV-genoom en de meerderheid van de genen zijn geconserveerd. Omdat RCMV-infectie in vivo bestudeerd kan worden, kan het rat/RCMV-systeem als model worden gebruikt om de functie van de CMV-genen, die homoloog zijn aan gastheer-genen, in vivo te bestuderen. Dit proefschrift beschrijft de karakterisatie van vier RCMV-genen die coderen voor respectievelijk een major immediate early transactivator (R122-123), een potentiële chemokine-receptor (R33), een orphan G protein-coupled receptor (R78) en een zware-keten MHC-klasse-I-molecuul (r144). De rol van R33, R78 en r144 is zowel in vitro als in vivo bestudeerd met behulp van mutant-RCMV-stammen, waarbij telkens een van deze genen was uitgeschakeld. De infectie-efficiëntie van deze mutanten is vergeleken met die van wild-type (wt) -RCMV in zowel verschillende celtypen in vitro, als in immuun-gecompromitteerde ratten. Infectie met de drie virus-mutanten, die zijn ontstaan door de uitschakeling van R33, R78 en r144 (respectievelijk RCMV Δ R33, RCMV Δ R78 en RCMV Δ r144), vertoonden verscheidene interessante fenotypen. RCMV Δ R33 replicateerde in vitro even efficiënt als wt-RCMV. Echter, de mutant was minder pathogeen dan wt-RCMV in

geïnfekteerde, immuungecompromitteerde ratten. Bovendien kon RCMV Δ R33 niet gedetecteerd worden in de speekselklieren van de rat - de belangrijkste organen voor virusrelicatie gedurende primaire RCMV-infectie. We concluderen diensengevolge dat het R33-gen een determinant is voor het speekselklier-tropisme van RCMV. De R78-deletiemutanten zijn, in tegenstelling tot RCMV Δ R33, ook in vitro verminderd in sterkte. Ze repliceren minder efficiënt in fibroblasten en gladde spiercellen in vitro dan wt-RCMV. De R78-deletiemutanten induceerden bovendien syncytium-vorming in geïnfekteerde fibroblasten in vitro. Hypothetisch gezien kan het R78-gen daarom betrokken zijn bij de stabilisatie van eiwitcomplexen die de cel-cel-verspreiding of uitscheiding van virus bewerkstelligen. The R78-deletiemutanten waren eveneens minder pathogeen dan wt-RCMV in vivo. Het is echter onduidelijk of de waargenomen syncytium-vorming in vitro kan worden gerelateerd aan de verminderde virulentie van deze mutanten in vivo. Een ander RCMV-gen dat bestudeerd is, r144, bevat MHC klasse I-homoloog-coderende sequenties. Deletie van dit gen uit het RCMV-genoom resulteerde in een recombinant-virus (RCMV Δ r144) dat met overeenkomstige efficiëntie replicateerde als wt-RCMV in vitro. Tegen de verwachtingen in waren we niet in staat verschillen in pathogeniciteit aan te tonen tussen wt- en mutant-virus bij geïnfekteerde, immuungecompromitteerde ratten. Desalniettemin werden verschillen geobserveerd tussen wt RCMV en RCMV Δ r144 in een rattenpootjes-model voor lokale infectie. We toonden aan dat de influx van macrofagen en CD8⁺-T-cellen op de plaats van inoculatie significant lager was in RCMV Δ r144-geïnfekteerde ratten, dan in wt-RCMV-geïnfekteerde ratten. Dit geeft aan dat het r144-gen een rol kan spelen in het recruter van een subpopulatie van leukocyten naar de plaats van initiële RCMV-infectie.